

CANDIFAST

Identifikation und Resistenztestung von Hefepilzen 30 Tests

(Ref. 44030)

CANDIFAST ES TWIN

Resistenztestung von Hefepilzen 30 Tests

(Ref. 44130)

CPB 0038 DE-2024-10
Für in-vitro-Diagnostik, für den professionellen Einsatz
Die Tests sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.



1 - TESTSYSTEME

Das CANDIFAST erlaubt die Identifikation der wichtigsten medizinisch relevanten Hefepilze und simultan eine Resistenztestung mit üblichen Antimykotika. Der CANDIFAST ES TWIN dient ausschließlich zur Resistenztestung gegen wichtige Antimykotika.

2 - EINLEITUNG

Die Häufigkeit der Pilzinfektionen besonders mit Hefepilzen, hat im der letzten zehn Jahren deutlich zugenommen (5). Hefepilze sind opportunistische Erreger. Die meisten sind Saprophyten, können aber pathogen werden wenn beim Wirt entsprechende Bedingungen vorherrschen. Ursachen können sein: a) Physiologische Faktoren vor allem bei Neugeborenen, älteren Personen und schwangeren Frauen; b) lokale Ursachen: feuchte Hautstellen, Hautreizungen; c) pathologische Ursachen bei immungeschwächten Personen mit schweren Grunderkrankungen oder Stoffwechselstörungen; d) iatrogene Faktoren: Antibiotikatherapien, Kontrazeptiva, Immunsuppressiva, ionisierende Strahlung, operative Eingriffe.... Durch Hefepilze verursachte Infektionen können in allen Organen auftreten: Haut- Haar- und Nagel-mykosen (Intertrigo, Onyxis...), Infektionen der Schleimhäute (Mund- Speiseröhren-, Dickdarm-Infektionen, Vaginitis...), Infektion der inneren Organe und Sepsis. Aufgrund des vermehrten Vorkommens von resistenten Pilzen ist eine Resistenztestung zu empfehlen um gezielt neue Antimykotika einsetzen zu können (1, 2).

3 - PRINZIP

Die Identifikation der Hefe beruht auf:

• Empfindlichkeit oder Unempfindlichkeit auf Actidion, wird durch die Umfärbung des Farbindikators auf gelb, gelb-orange oder auf rötlich (fuchsin) sichtbar • durch den Abbau von sieben Glukosen sinkt der pH Wert, was ebenfalls zu einer Umfärbung des Farbindikators auf gelb oder gelb-orange führt • Durch die Harnstoff Aktivität wird das Medium alkalisch und verfärbt sich rötlich (fuchsin). Die Resistenztestung der Hefen beruht auf das Wachstum in Gegenwart von Antimykotika. Dieses Wachstum wird durch einen Farbumschlag des Mediums sichtbar: • der Abbau der Glukose durch die Hefen führt zu einer Ansäuerung des Mediums und damit zu einer Umfärbung des im Medium vorhandenen Phenol-Rotes auf gelb oder gelb-orange. • die Hydrolyse des Harnstoffes durch urease positive Hefepilze setzt Ammoniak frei, der das Medium alkalisiert und zu einer rosa-rötlichen Umfärbung führt.

4 – REAGENZIEN

Bestandteile:		
Reagenzien	Quantité	
	#44030	#44130
CANDIFAST	30	-
CANDIFAST ES Twin	-	15
R1: Reagenzfläschchen 1	35	35
R2: Reagenzfläschchen 2	30	30
TC: Kontrolle zur Trübungsmessung	1	1

Beschreibung

CANDIFAST Platte: Gebrauchsfertige Platte mit 20 Vertiefungen.
Mit jeder Platte wird eine Probe getestet (Identifikation und Resistenztestung).

Serie für die Identifikation

Die Vertiefung 1 enthält Actidion (ACT), Glukose und Phenol-Rot.

Die Vertiefungen 2 bis 8 enthalten verschiedene Zucker und Phenol-Rot :
Vertiefung 2 (GLU) : Glukose
Vertiefung 3 (GAL) : Galaktose
Vertiefung 4 (TRE) : Trehalose
Vertiefung 5 (MAL) : Maltose
Vertiefung 6 (CEL) : Cellobiose
Vertiefung 7 (RAF) : Raffinose
Vertiefung 8 (LAC) : Laktose
Die Vertiefungen 9 und 10 sind leer.

CANDIFAST ES Twin: Gebrauchsfertige Platte mit 2 x 10 Vertiefungen. Die zwei Reihen entsprechen dem gleichen Aufbau zur Resistenztestung wie beim CANDIFAST.

Jede Platte ermöglicht daher zwei Patientenproben zu testen (nur Resistenztestung).

R1: Fläschchen mit 4 mL dickflüssigem gepuffertem Medium zum Verdünnen und Identifizieren. Beefextrakt 1,3 g/L, Kasein- Peptone 1,8 g/L, Hefeeextrakt 0,8 g/L, Aminosäuren, Vitamine, Minerale 5,75 g/L, Harnstoff 20 g/L, Agar 0,52 g/L, Antibiotika 1,12 g/L, pH-Wert: 6,05 ± 0,1.

R2: Fläschchen mit 2 ml flüssigen Medium zur Resistenztestung. Beefextrakt 1,3 g/L, Kasein-Peptone 1,8 g/L, Hefeeextrakt 0,8 g/L, Aminosäuren, Vitamine, Minerale 8,75 g/L, Harnstoff 20 g/L, Glukose 8,5 g/L, Phenol-Rot 0,052 g/L, Antibiotika 1,16. pH-Wert: 7,3 +0,1.

Trübungskontrolle: Fläschchen mit 4 mL Barium-Sulfat,

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reagenzien dieses Kits sind einzig für in vitro Gebrauch bestimmt und müssen von bevollmächtigten Personen verwendet werden.
- Die Proben und die eingepflegten Reagenzien sind möglicherweise infektiös, sie müssen mit den üblichen Vorsichtsmassnahmen behandelt werden, mit Rücksicht auf die gesetzlichen Gegebenheiten, die im jeweiligen Land für diese Produkte vorgeschrieben sind.
- Die Reagenzien enthalten Rohstoffe mit tierischer Herkunft und müssen daher entsprechend behandelt werden.
- Abgelaufene Reagenzien müssen entsorgt werden.
- Beschädigte oder falsch gelagerte Reagenzien dürfen nicht mehr verwendet werden.

6 - SAMMLUNG DER PROBEENTNAHMEN

Die Identifizierung und der Resistenztestung erfolgt von Kolonien die:

- 24 bis 48 Stunden
- bei Zimmertemperatur oder bei 37 °C auf einem festem Nährboden in Petri Schalen kultiviert wurden. Es wird empfohlen, die Isolierung auf speziellen Medien für Hefen durchzuführen (3).

7 - AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien werden bei 2-8 °C in der Originalverpackung aufbewahrt und sind bis zum Verfallsdatum (am Kit angegeben) stabil. Die nicht benötigte Hälfte der CANDIFAST ES Twin Platte kann 7 Tage lang bei 2-8°C in der fest verschlossenen Originalverpackung mit einem Trockenmittel aufbewahrt werden.

8 - ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Paraffinöl
- Sterile Pipetten
- Brutschrank, 37 °C
- Behälter für infektiöse Abfälle

9 - METHODE

Die Reagenzien müssen vor deren Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden.

9.1. Vorbereitung des Inokulums

Mit Hilfe einer Impföse wird eine Einzelkolonie entnommen und das Fläschchen 1 inokuliert und gut durchmischt. Die Standardisierung des Inokulums kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden:

•Vergleich zum TC Fläschchen, Trübungskontrolle

Die Trübung des beimpften Reagenz 1 an das TC Fläschchens anpassen. Zum

Serie für den Resistenztestung

Die Vertiefung 1 ist eine Wachstums-Kontrolle (C+). Die Vertiefungen 2 bis 8 enthalten verschiedene Antimykotika:
Vertiefung 2 (AB): Amphotericin B (4 µg/mL)
Vertiefung 3 (NY): Nystatin (200 µg/mL)
Vertiefung 4 (FCT): Flucytosin (35 µg/mL)
Vertiefung 5 (ECZ): Econazol (16 µg/mL)
Vertiefung 6 (KTZ): Ketoconazol (16 µg/mL)
Vertiefung 7 (MCZ): Miconazol (16 µg/mL)
Vertiefung 8 (FCZ): Fluconazol (16 µg/mL)
Die Vertiefungen 9 und 10 sind leer.

Vergleich dienen die schwarzen Striche auf dem Etikett des TC Fläschchens. Wenn das Reagenzien 1 klarer ist (zuwenig Inokulum), muss noch Kulturmateriel hinzugefügt werden. Wenn das Reagenzien 1 trüber ist (zuviel Inokulum), kann mit einem neuem Reagenzfläschchen 1 die Trübung durch entsprechendes Verdünnen eingestellt werden.

• Mit Hilfe eines Turbidimeters

Mit Hilfe eines Turbidimeters, prüfen ob die Trübung des beimpften Reagenz 1, gleich 1 Mac Farland ist. Wenn nötig, die Trübung entsprechend anpassen.

• Aufzählung in Malassez-Zellen

Es ist möglich, das Inokulum zu standardisieren, indem eine Zählung der Hefen in Malassez-Zellen durchgeführt wird. Die Lösung muss ein Zellzahl von 2500 bis 3500 Hefen pro mm³ enthalten.

9.2a Beimpfung der CANDIFAST Platte

Vertiefungsserie für die Identifizierung

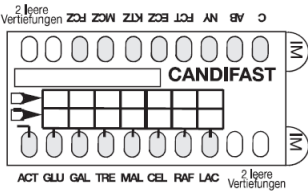
Die Klebefolie so abziehen, dass alle Vertiefungen beimpft werden können jedoch noch am Rand der Platte klebt. Verteilen Sie in jede der 8 ersten Vertiefungen:
- 100 µL beimpftes und standardisiertes R1
- 2 Tropfen Paraffinöl.

Die Platte mit der Klebefolie wieder verschließen.

Serie für die Resistenztestung

Zu Reagenz 2 werden 100 µL vom beimpften und standardisiertem Reagenz 1 beigemischt. (cf. § 9.1). Die Klebefolie abziehen und in jeder der 8 Vertiefungen wie folgt zugeben:
- 100 µL vom R2 (mit R1 beimpft)
- 2 Tropfen von Paraffinöl.

Die Platte mit der Klebefolie wieder verschließen.



9.2b. Beimpfung der CANDIFAST ES Twin

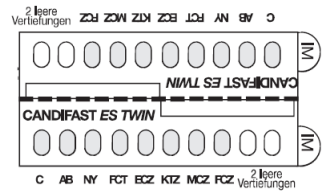
Tray Serie für eine Probe

Zu Reagenz R2 werden 100 µL beimpftes und standardisiertem Reagenz R1 pipettiert. Die beiden Reihen der Platte entsprechend beschriften. Die Klebefolie abziehen und in jede der 8 Vertiefungen wie folgt zugeben:
- 100 µL Reagenz 2 (mit R1 beimpft)
- 2 Tropfen Paraffinöl.

Die Platte mit der Klebefolie wieder verschließen.

Serie für die zweite Probe

Die zweite Reihe wird mit einem weiteren Fläschchen R2 beimpft wie oben beschrieben. Die Platte mit der Klebefolie wieder verschließen.



9.3. Inkubation

Die Platte 24 Stunden bei 37 °C Stunden inkubieren, je nach Bedarf und je nach Stamm, die Inkubation bis 48 Stunden oder sogar bis auf 72 Stunden verlängern. Die Auswertung erfolgt sobald die Kontrollvertiefung positiv wird.

10 - ABLESUNG UND INTERPRETATION DER PLATTE

Die gesamte Platte wird erst ausgewertet, wenn in der Kontrollvertiefung (C+: Vertiefung 1 für den Resistenztest), eine Farbveränderung zu sehen ist: Umfärbung auf gelb, gelb-orange, oder fuchsin (für urease positive Spezies)

10.1 Serien für die Identifizierung

Vertiefung 1 (ACT): Als positiv gilt, wenn in der Vertiefung ACT eine Farbveränderung des Mediums beobachtet wird:

- Eine Umfärbung auf gelb, gelb-prange oder fuchsin

Tritt keine Farberänderung auf so ist dies als negativ zu werten.

Vertiefung 2 bis 8 (GLU in RAF): Als positiv gilt, wenn in einer der Vertiefungen eine Farbveränderung im Medium beobachtet wird:

- Farbveränderung nach gelb, gelb-prange, oder fuchsin

Tritt keine Farberänderung auf so ist dies als negativ zu werten.

Die Identifizierung der Hefen wird mit Hilfe der Auswertung der Platte und der Morphologie der Kolonien durchgeführt. Zur Interpretation dient die unten angeführte Tabelle oder die Beilage im Kit. Auf der Klebefolie befindet sich ebenfalls ein Auswerteschema: die Vertiefung Actidion (ACT) ablesen, sich dann die letzte positive Vertiefung rechts merken. Der Name des Keimes wird auf der Klebefolie am Schnittpunkt vom Actidion (positive oder negative Reihe) und dem letzten positiven Zucker abgelesen.

Hefe	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	V	+	-	-	-
<i>Candida albicans (var stellatoidea)</i>	+	+	-	V	+	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	V	+	-	+	-	-	-	-
<i>Candida kefyr</i>	+	+	+	-	-	-	V	+
<i>Candida krusei</i>	V	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	+	+	V	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	+	-	V	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	+	+	V	V	V	+	-
Arten <i>Cryptococcus</i> oder <i>Trichosporon</i> oder <i>Rhodotorula</i>	V							positiver urease

V : variable (+ oder -)

Zusätzliche Diagnostik

Die Arten *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Rhodotorula* können anhand der morphologischen Charakters unterschieden werden.

- *Rhodotulora* ergibt auf Sabouraud-Agar, sehr charakteristische lachsfarbene Kolonien.

- *Cryptococcus* besitzt eine Polysaccharid-Kapsel die mit 5 fach verdünnter Tinte gefärbt werden kann. Auf Sabouraud-Agar sind die Kolonien lachsfarben, jedoch weniger intensiv wie die Rhodotulora-Kolonien.

- Trichosporon zeigt eine Pseudomycelium auf PCB Medium.

Bemerkungen

• In der Gattung *Saccharomyces* ist *Saccharomyces cerevisiae* die häufigste humanpathogene Art.

• Stämme von *Saccharomyces boulardii* oder *Saccharomyces cerevisiae* können bei Patienten, die mit einer auf Hefe-Therapie beruhenden Behandlung, isoliert werden.

• Eine mikroskopische Analyse ermöglicht, die zwei Arten zu unterscheiden:

- *S. cerevisiae* sind große kugelförmige Hefen.
- *S. boulardii* sind kleinere eiförmige bis lang gezogene, ovale Hefen.

• In der CANDIFAST Platte können bestimmte *Cryptococcus* Stämme in Anwesenheit von Actidion wachsen.

10.2 Serien für den Resistenztest

Vertiefungen 2 bis 8 (AB bis FCZ)

Eine Farbveränderung des Mediums auf gelb, gelb-prange oder fuchsin weist auf ein Wachstum hin und somit besteht eine Resistenz gegen die jeweilige Konzentration des Antimykotikums.

Hingegen zeigt die Rot-Orange Farbe des Mediums an, dass der Stamm durch das enthaltene Antimykotikum gehemmt worden ist.

11 - QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Standardisierung der Methode zu prüfen, wird empfohlen eine Qualitätskontrolle regelmäßig durchzuführen. Dazu können die Referenz-Stämme, *Candida albicans* ATCC 90029 und *Candida parapsilosis* ATCC 22019 verwendet werden.

Stamm	Inkubation	Erwartete Resultate											
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	NY	FCT
<i>C. albicans</i> (ATCC 90029)	24 Stunden	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	48 Stunden	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

12 - TROUBLESHOOTING

• Die Trübung des Inokulums schlecht eingestellt.

- Inoculums enthält eine Mischkultur oder Kolonien die älter als 48 Stunden sind.
- Ablesen der Platte bevor es zu einer Farbveränderung in der Wachstumskontrollvertiefung gekommen ist.
- Ablesen der Platte 24 oder 48 Stunden nach der Farbveränderung in der Wachstumskontrollvertiefung. Allgemein, die Nichtbeachtung der Empfehlungen der Packungsbeilage.

13 - GRENZEN DER METHODE

• Diese in vitro Testmethode zur Bestimmung der Antimykotika-Resistenz, hat einen indikativen-Wert auf die Interaktion der Antimykotika - Hefe Beziehung bei Behandlungen in vivo (2,4).

• Die CANDIFAST Methode wurde entwickelt, für die Identifizierung und die Resistenztestung von Stämmen die von Haut und Schleimhaut isoliert wurden; er wird also nicht für systemisch isolierte Pilzstämmen empfohlen.

• Die CANDIFAST-Methode erlaubt keine Kategorisierung in sensibel-intermediär-

resistent.

• Wärmeempfindliche Stämme, die bei 20 °C isoliert werden, wachsen anders bei 37 °C. In diesem Fall wachsen die Hefen nicht oder schlecht und die Identifizierung ebenso wie die Resistenztestung können nicht durchgeführt werden.

• Für gewisse Stämme von *C. lusitanae* kommt es zu einer Wachstumsverspätung in der Vertiefung TRE, die Identifizierung durch Auswertung der Tabelle ist in diesem Fall nicht möglich, Die Auswertung mittels Etiketts auf der Platte ist jedoch möglich.

• Bei manchen *C. glabrata*-Stämmen, ist die GAL Vertiefung schwierig abzulesen. In diesem Fall ist eine Auswertung mittels Tabelle nicht möglich. Die Auswertung mittels Etiketts auf der Platte ist jedoch möglich,

• Bei der Interpretation der Resistenztestung darf die Trübung nicht in Betracht gezogen werden da ein Schleier nach der Inkubation mit azolhaltigen Antimykotika auftreten kann.

14 - LEISTUNGEN

Untersuchung mit der Stammsammlung

Die Untersuchung wurde mit 80 Stämmen (31 *Candida albicans*, 17 *C. glabrata*, 11 *C. tropicalis*, 6 *C. lusitanae*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 2 *C. krusei*, 5 *Saccharomyces spp.*, 2 *Cryptococcus neoformans* und 1 *Trichosporon cutaneum*.) durchgeführt. 78 Stämme wurden durch die Ablesung, mit Hilfe vom Etikett, richtig identifiziert, oder 97.5%ige Übereinstimmungen zum FUNGICHROM von ELITech MICROBIO oder API 32C von Biomérieux, Die Gesamt-Übereinstimmung des Resistenztests, durch Vergleich auf FUNGITEST von Biorad und der ATB Fungus von Biomérieux, ist 87,4%.

Untersuchung auf Klinische Stämme

Die Untersuchung wurde auf 100 frisch isolierte Stämme, klinischer Proben durchgeführt (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* und 1 *Saccharomyces spp.*). 98 Stämme wurden korrekt identifiziert verglichen mit dem VITEK System von Biomérieux.

Die geneerelle Übereinstimmung des Resistenztestes, im Vergleich zum FUNGITEST von Biorad und die ATB Fungus von Biomérieux, ist 98.5 %. Unter den 10 unklaren Ergebnissen, sind 3 wesentliche und 7 unwesentliche Ergebnisse. Diese unklaren Ergebnisse betreffen 4 Stämme (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* und 1 *C. tropicalis*) und 3 Antimykotika darunter das Econazol (2 R/I und 1 R/S), das Ketoconazol (1R/ und 2 R/S) und das Miconazol (4 R/I).

15 - ENTSORGUNG

Der Abfall muss entsprechend der gesetzlichen Vorschriften für die jeweiligen Reagenzien entsorgt werden.

16 – BÜCHERNACHWEIS

1. DUPONT B. 1987. Résistance de Candida aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Chap. 4, 23-26.

2. DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, I. VICENS, et C. TOURTE-SCHAEFER. 1989. Intérêts et limites de l'antifongigramme. Rev. Fr. Lab. **197** : 69-72.

3. GRILLOT R., B. LEBEAU et I. SELBMANN. 1989. Isolement et identification des levures, données récentes et perspectives. Rev. Fr. Lab. **197**: 24-32.

4. PAUGAM A. 1996. Intérêt de l'étude in vitro de la sensibilité des levures aux antifongiques. Rev. Fr. Lab. **282**: 157-159.

5. KOENIG H., J. WALLER et M. KREMER. 1989. Diagnostic et aspects épidémiologiques de 70 000 levures isolées en 8 ans. Rev. Fr. Lab., **197**, 34-38.

Die Änderungen seit der letzten Revision sind grau hinterlegt.



ELITech MICROBIO
 Parc d'activités du plateau
 19, allée d'Athènes
 83870 SIGNES
 FRANCE
 Tel : 33 (0)4 94 88 55 00
<http://elitechgroup.com>